

⑱ 公開特許公報 (A) 昭63-218620

⑲ Int. Cl.⁴A 61 K 31/395
// C 07 D 225/06
491/06

識別記号

A D U

庁内整理番号

7330-4C
8413-4C
7430-4C

⑳ 公開 昭和63年(1988)9月12日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

㉑ 発明の名称 癌化細胞の正常化剤

㉒ 特願 昭62-53478

㉓ 出願 昭62(1987)3月9日

㉔ 発明者 大村 智 東京都世田谷区瀬田5-12-7

㉕ 発明者 佐野 浩 東京都町田市玉川学園7-19-16

㉖ 出願人 協和酵素工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明細書

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はハーピマイシン誘導体を有効成分として含有する癌化細胞の正常化剤に関する。

従来技術

ハーピマイシンはアンサマイシン系抗生物質に分類される抗生物質で除草活性、抗タバコモザイクビール活性およびP388ロイケミア、B16メラノーマ、L1210ロイケミア、ルイス・ラング・カルシノーマ、エーリッヒ・アサイテス・カルシノーマ等を用いたマウス実験動物系において抗腫瘍活性を示すことが知られている。ある種のハーピマイシンの誘導体がエーリッヒ・アサイテス・カルシノーマを用いたマウス実験動物系において抗腫瘍活性を有することが知られている。

[J. Antibiotics, 37, 1264(1984); 39, 415(1986)]

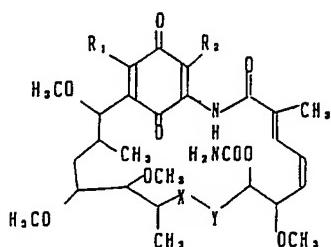
それらの誘導体の中には治療効果が母化合物であるハーピマイシンAと比較して優れているものも見出せるが、その効果を顯わすのに必要な投与量はハーピマイシンAの20~100倍となっている。

1. 発明の名称

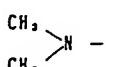
癌化細胞の正常化剤

2. 特許請求の範囲

式



(式中、R₁およびR₂はHまたは



$\text{CH}_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-$ 、 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-$

であり、X-Yは



または



である)

で表されるハーピマイシン誘導体を有効成分として含有する癌化細胞の正常化剤

る。ハービマイシンAの場合、最適投与量以上マウスに投与すると毒性死することを考えるとこれらの誘導体では毒性が $1/20$ ~ $1/100$ に減じているものと思われる。

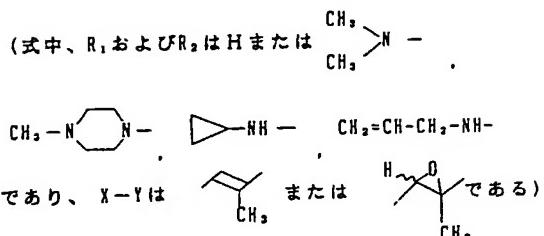
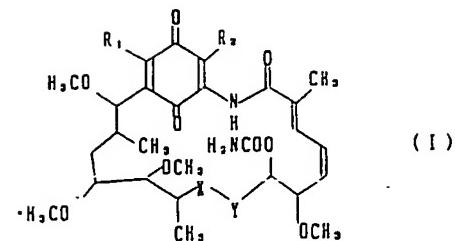
温度感受性癌遺伝子v-srcを含むラット腎細胞(src⁺/NRK)は許容温度の33℃では癌の形態をとて増殖するが、非許容温度の39℃では正常の形態で増殖する。そしてハービマイシンAが33℃において癌から正常への形態変化を起こす。すなわち癌化した細胞を正常の細胞に直すことが知られている。[Mol. Cell. Biol., 6, 2198(1986)]

発明が解決しようとする問題点

癌化した細胞を正常な細胞に直す優れた化合物が求められている。

問題点を解決するための手段

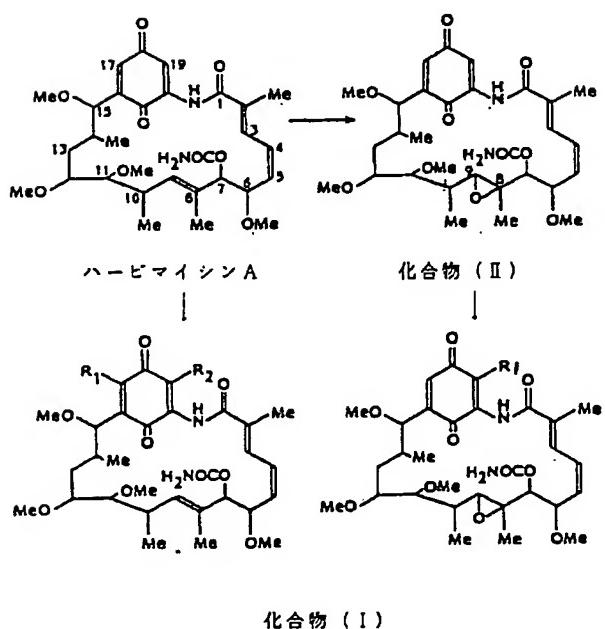
本発明によれば一般式(I)



で表されるハービマイシン誘導体【以下化合物(I)という】が癌化細胞を正常化する優れた活性を有することが見出された。

次に化合物(I)の製造方法について説明する。

化合物(I)はハービマイシンAあるいはその8位の二重結合がエポキシ基に変換された誘導体【化合物(II)】に置換アミンを酸化的に付加することによって製造することができる。



(式中、MeはCH₃を示し、R₁、R₂は前記と同義である。)

化合物(II)はハービマイシンAを有機溶媒中

で1~3等量のm-クロロ過安息香酸と0~50℃で3~12時間反応させることによって製造できる。有機溶媒としてはクロロホルム、ジクロロメタン、四塩化炭素、ジクロロエタン、トリクロロエタン、ベンゼン、トルエン、酢酸エチル、アセトン、エタノール、メタノール、2-メトキシエタノール、エチレングリコール、エチレングリコールジメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン等を挙げることができる。クロロホルム中で1.2倍モルのm-クロロ過安息香酸を用い、25℃、6時間反応させることが好ましい。反応混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製することができる。

化合物(I)はハービマイシンAあるいは化合物(II)を有機溶媒中で置換アミンと0~50℃で12~96時間反応させることによって製造することができる。有機溶媒としては前記したものと同一のものを使用できる。置換アミンとしてはジメチルアミン、メチルビペラジン、シクロプロピルアミン、アリルアミンを使用することができ

る。ベンゼン中27°Cで48時間反応させることができない。

急性毒性試験

6週齢、雄のDDYマウス（25±1g、1群3匹）に、2%のアラビアゴムを含む生理食塩水に懸濁した薬剤をi.p.で投与し、24時間後の生存率から50%生存投与量（LD₅₀）を上げ下げ法で算出した結果、化合物（I）はLD₅₀；>200mg/kgであった。

化合物（I）は生理食塩水、ブドウ糖、ラクトース、マンニット注射液に適当な界面活性剤例えばTween 80を助剤として加え化合物（I）を懸濁させ、これを1~1000mg/kg、1日1~3回で静脈内あるいは局所に投与される。

実施例

化合物（I）のsrc⁺NRK細胞に対する作用をハーピマイシンAと比較して表に示す。

化 合 物	IC ₅₀ (μg/ml)	形態変化の有無
1	0.17	+
2	3.1	+
3	1.0	+
ハーピマイシンA	0.45	+

〔方法〕

細胞：Rous sarcoma virus Prague strain、ts25で感染したラットの腎細胞（src⁺NRK細胞）

培地：5% heat-inactivated calf serum (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y. 製) を含む Dulbecco modified Eagle medium (GIBCO Laboratories 製) を含む Dulbecco modified Eagle medium (GIBCO Laboratories 製)

培養条件：直径35mmのシャーレ中に2mlの培地を取り3×10⁴個の細胞を接種した。次いで薬剤を加え5%の炭酸ガスを含む加温空气中で、33°Cで1日間培養

した後、細胞数および細胞形態を顕微鏡で観察した。

参考例1.

19-アリルアミノハーピマイシンAの製造

ハーピマイシンA（3.0g）とアリルアミン（5.0ml）をベンゼン（100ml）に溶解し、室温に24時間放置する。反応液を減圧濃縮すると紫色の粉末物質が得られる。粉末物質をベンゼン：酢酸エチル=1：1を展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製すると標題化合物が赤紫色粉末として得られる。1.06g（32.3%）

TLC Rf値：0.45（ベンゼン：酢酸エチル=1:1）

旋光度：[α]_D²⁵ -124.0° (C 1.0, CHCl₃)

紫外線吸収スペクトル： $\lambda_{\text{max}}^{\text{HOR}}$ nm (ε) 247 (13,100), 335(900)

マススペクトル：m/z 629 (M⁺, C₁₃H₁₇N₃O₂)

核磁気共鳴スペクトル (CDCl₃ 中)：

δ (ppm) 4.46 (brs, H-15), 6.48 (d, J=1.8Hz,

H-17), 7.45 (m, NH)

参考例2.

17-シクロプロピルアミノハーピマイシンAの製造

ハーピマイシンA（3.0g）とシクロプロピルアミン（5.0ml）をベンゼン（100ml）に溶解し、室温に48時間放置する。反応液を減圧濃縮すると、赤紫色の粉末物質が得られる。粉末物質をベンゼン：酢酸エチル=1：1を展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製すると、標題化合物が赤紫色粉末として得られる。1.63g (49.6%)

TLC Rf値：0.60 (ベンゼン：酢酸エチル=1:1)

旋光度：[α]_D²⁵ -138.0° (C 0.2, CHCl₃)

紫外線吸収スペクトル： $\lambda_{\text{max}}^{\text{HOR}}$ nm (ε) 245 (12,000)

マススペクトル：m/z 629 (M⁺, C₁₃H₁₇N₃O₂)
核磁気共鳴スペクトル (CDCl₃ 中)：

δ (ppm) 4.48 (brs, H-15), 6.95 (s, H-19),

7.59 (brd, NH)

参考例3.

8,9-エポキシ-19-シクロプロビルアミノハーピマイシンAの製造

ハーピマイシンA (7.0 g) とm-クロロ過安息香酸 (2.1 g) をクロロホルム (300ml) に溶解し、室温で24時間放置する。反応液を水冷しながら飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、クロロホルム層を抽出する。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮すると、黄色粉末が得られる。粉末物質をベンゼン：酢酸エチル=1:1を展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製すると、8,9-エポキシハーピマイシンAが淡黄色粉末として得られる。4.70 g (65.3%)

TLC Rf値: 0.54 (ベンゼン：酢酸エチル=1:1)

8,9-エポキシハーピマイシンA (1.0 g) とシクロプロビルアミン (6.0ml) をベンゼン (100ml) に溶解し、室温に70時間放置する。反応液を減圧濃縮すると、赤紫色の粉末物質が得られる。粉末物質をベンゼン：酢酸エチル=1:

1を展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製すると標題化合物が赤紫色粉末として得られる。0.51 g (45.4%)

TLC Rf値: 0.15 (ベンゼン：酢酸エチル=1:1)

旋光度: [α]_D²⁵ -135.0° (C 0.3, CHCl₃)

紫外線吸収スペクトル: λ_{max} nm (ε) 265 (21,500)

マススペクトル: m/z 645 (M⁺, C₁₉H₂₇N₃O₁₀)

核磁気共鳴スペクトル (CDCl₃: 中):

δ (ppm) 4.57 (brs, H-15), 6.50 (d, J=1.8 Hz, H-17), 6.68 (brd, NH)

特許出願人(102) 協和醸酵工業株式会社

代表者 加藤幹夫

